Über ein äskulinspaltendes Enzym und über ein fettspaltendes Enzym in Aesculus Hippocastanum L.

von

Dr. **Wilhelm Sigmund,**

k. k. Realschulprofessor, Privatdozent an der k. k. deutschen technischen Hochschule in Prag.

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. April 1910.)

Das äskulinspaltende Enzym.

Die erste und, soweit mir bekannt, die einzige Beobachtung über eine enzymatische Äskulinspaltung bei *Aesculus* machte Weewers,[1] welcher dieselbe bei einem Kaltwasserextrakte der Roßkastanienrinde wahrnahm; doch wurde die Frage nicht weiter untersucht.[2]

Es ist mir gelungen, in einigen Organen der Roßkastanie, *Aesculus Hippocastanum* L., ein äskulinspaltendes Enzym nachzuweisen.

Untersucht wurden insbesondere die Rinde, die Knospen, die Blätter, die Blüten und die Früchte, von den letzteren gesondert die Samenkapseln, die Samen im ganzen, die Samenschalen und die Cotyledonen. Die Samen wurden sowohl im ruhenden als auch im keimenden Zustande auf ein äskulinspaltendes Enzym geprüft; von den keimenden Samen wurden wieder die Würzelchen, die Stengelchen und die Cotyledonen gesondert untersucht. Die betreffenden Pflanzenteile wurden teils frisch, teils lufttrocken möglichst zerkleinert (durch Zerschneiden, Mahlen, Verreiben etc.), die zerkleinerten Organe

---

[1] Th. Weewers, Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside. Jahrb. f. wiss. Botanik, 39. Bd. (1904), p. 229.

[2] F. Czapek, Biochemie der Pflanzen, II. Bd., p. 563.

mit Wasser unter Zusatz von Chloroform 20 bis 40 Stunden[1] bei Zimmertemperatur extrahiert.

Zu Versuchszwecken wurden der Organbrei, der filtrierte wässerige Extrakt und die aus dem letzteren isolierte enzymhaltige Substanz benützt. Zur Isolierung des Enzyms wurde der filtrierte Auszug mit Alkohol gefällt, der Niederschlag rasch an der Saugpumpe filtriert, mit Alkohol gewaschen und bei 30° C. im Trockenschrank oder bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure getrocknet.

Die Einwirkungsdauer des Extraktes, beziehungsweise des Enzyms auf Äskulin betrug 24 Stunden bis 10 Tage bei 30° C. Um die Mitwirkung von Mikroorganismen auszuschließen, wurden sämtliche Versuche unter reichlichem Zusatz von Toluol, meist aber von Chloroform ausgeführt; bei längerer Versuchsdauer wurden die Antiseptika erneuert. Die Abwesenheit von Bakterien konnte auch mikroskopisch festgestellt werden.

Jeder Versuch war von einem Kontrollversuch begleitet, indem nicht nur der normale, aktive Organextrakt, beziehungsweise das daraus isolierte aktive Enzym auf Äskulin einwirkte, sondern gleichzeitig und unter den vollkommen gleichen Versuchsbedingungen der gekochte Extrakt, respektive die gekochte Enzymlösung auf Äskulin wirksam war. Dabei konnte, falls eine Spaltung des Äskulins eintrat, diese nur bei dem aktiven Extrakt oder Enzym, nicht aber bei dem Kontrollversuch beobachtet werden, wodurch die Enzymnatur der erfolgten Äskulinspaltung sichergestellt war.

Die Untersuchung der Spaltungsprodukte des Äskulins, des Äskuletins und der Glukose geschah auf folgende Weise: Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde der Inhalt des Versuchsgefäßes kalt filtriert, der Rückstand auf dem Filter mit heißem Alkohol behandelt und die Lösung auf Äskuletin geprüft.

Zur Erkennung des Äskuletins dienten folgende Reaktionen: die Grünfärbung mit Eisenchlorid, auf Zusatz von Ammoniak rot; die Gelbfärbung mit Kali- oder Natronlauge; die gelbe

---

[1] Je nach der Beschaffenheit des Materials in frisch gepflücktem Zustande kürzere, in lufttrockenem Zustande längere Zeit.

Fällung mit Bleiacetat. Die Intensität der Grünfärbung mit Eisenchlorid ließ auch bei Einhaltung vollkommen gleicher Versuchsbedingungen eine beiläufige Beurteilung der Stärke der erfolgten Äskulinspaltung zu, indem sich die Lösung bei gleicher Menge und gleicher Konzentration der einwirkenden Stoffe je nach der Intensität der erfolgten Äskulinspaltung gelblichgrün, rein hellgrün, grasgrün bis intensiv dunkelgrün färbte. Durch wiederholtes Umkrystallisieren konnten aus der äskuletinhältigen Lösung feine, glänzende Nadeln dargestellt werden, deren Identität mit Äskuletin durch die oben genannten Reaktionen festgestellt werden konnte, außerdem wurde auch zur Kontrolle die Bestimmung des Schmelzpunktes herangezogen.

Das zuerst erhaltene Filtrat wurde auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand mit heißem Alkohol behandelt, wobei das Enzym ungelöst blieb, während die eventuellen Spaltungsprodukte des Äskulins, das Äskuletin und die Glukose, in Lösung gingen; ein Teil der Glukose blieb, da in Alkohol schwer löslich, im Rückstande und wurde daraus durch Wasser extrahiert. Nach dem Filtrieren wurde das Filtrat abermals auf dem Wasserbad verdunstet und der Rückstand mit wenig kaltem Wasser behandelt, wodurch eine wenn auch unvollständige Trennung des Äskuletins von der Glukose bewirkt wurde, indem neben der Glukose auch ein geringer Teil des Äskuletins in Lösung ging, der größere Teil blieb aber auf dem Filter zurück; dieser wurde mit Alkohol behandelt und die Lösung auf Äskuletin untersucht.

Im Filtrat wurde nach den gebräuchlichen Methoden, wobei insbesondere die Trommer'sche in Anwendnng kam, auf Glukose geprüft. Bei einer stattgefundenen Äskulinspaltung färbte sich die Flüssigkeit auf Zusatz von Natronlauge intensiv gelb infolge des in der Lösung gleichzeitig enthaltenen Äskuletins; bei dem Kontrollversuch mit dem gekochten Enzym trat diese intensive Gelbfärbung nicht auf, die betreffende Flüssigkeit färbte sich nur hell strohgelb, bedingt durch das unzersetzte Äskulin; auch die anderen Reaktionen auf Äskuletin ergaben bei den Versuchen mit dem gekochten Enzym ein negatives Resultat. Auch die Reaktion auf Glukose lieferte bei den Ver-

suchen mit dem normalen Enzym bei erfolgter Spaltung des zugesetzten Äskulins stets ein positives Ergebnis, die Reaktion verlief rasch und intensiv; bei den Kontrollversuchen dagegen blieb die Glukosereaktion entweder gänzlich aus oder sie erfolgte erst nach längerer Zeit und minder intensiv.

Versuche mit der Rinde.

Untersucht wurde die Rinde der Zweige und der Wurzeln. Die Rinde der Zweige wurde in allen Jahreszeiten, im Frühjahr, Sommer, Herbst und Winter, die Rinde der Wurzeln im Frühjahr (März) auf ein äskulinspaltendes Enzym geprüft. Die meisten Versuche wurden mit der im Mai und Juni entnommenen Rinde ausgeführt.

Die mit der Rinde der Zweige ausgeführten Versuche ergaben, daß in derselben in allen Jahreszeiten ein auf Äskulin wirksames Enzym enthalten war. Selbst aus der im Winter (am 22. Dezember) gesammelten Rinde konnte noch ein äskulinspaltendes Enzym isoliert werden, welches zwar, was Geschwindigkeit und Intensität der Äskulinspaltung anbelangt, hinter den in den anderen Jahreszeiten hergestellten Enzympräparaten zurückblieb, aber trotzdem eine deutlich nachweisbare äskulinspaltende Wirkung erkennen ließ. Während nämlich die aus den im Frühjahr, Sommer und Herbst entnommenen Rinden hergestellten Enzympräparate bereits nach 24 Stunden eine deutliche Spaltung des zugesetzten Äskulins bewirkten, die sich mit zunehmender Versuchsdauer steigerte, so spaltete z. B. ein Enzympräparat vom 8. Oktober nach dreitägiger Einwirkungsdauer 45·17 % des zugesetzten Äskulins, konnte bei dem aus der Winterrinde isolierten Enzym nach 24 stündiger Einwirkungsdauer nur eine minimale Spaltung beobachtet werden; doch nahm die Intensität der Äskulinspaltung innerhalb der siebentägigen Versuchsdauer von Tag zu Tag zu, wie die vergleichenden kolorimetrischen Beobachtungen ergaben.

Bei den Versuchen mit der Wurzel[1] wurden die dünnen Wurzeln bis zur Federkieldicke im ganzen zerkleinert und bei den dickeren Wurzeln bloß die Rinde verarbeitet. Die Versuche

---

[1] Die Wurzel wurde anfangs März einem älteren Baume entnommen.

ergaben, daß die Einwirkung auf Äskulin eine viel schwächere war als bei der Rinde der Zweige.

Versuche mit den Knospen.

Es wurden sowohl die Frühjahrs- als auch die Herbstknospen auf die Gegenwart eines äskulinspaltenden Enzyms untersucht. Die wässerigen Extrakte wurden aus den nach Entfernung der harzigen Schuppenblätter zerkleinerten Knospen hergestellt. Weder die Extrakte noch die daraus durch Alkohol isolierte Substanz bewirkte eine Spaltung des zugesetzten Äskulins, selbst nach neuntägiger Versuchsdauer nicht.

Versuche mit den Blättern und Blüten.

Die Versuche mit den Kaltwasserextrakten der Blätter und mit dem daraus durch Fällung mit Alkohol erhaltenen Körper ergaben bei ihrer Einwirkung auf Äskulin ein vorwiegend negatives Resultat; erst bei längerer Einwirkungsdauer trat in einzelnen Fällen ein schwach positives Ergebnis auf.

Während bei den gleichzeitig und unter denselben Versuchsbedingungen ausgeführten Versuchen mit den Rindenextrakten und mit dem daraus isolierten Enzym bereits nach 24 Stunden eine deutliche Spaltung des zugesetzten Äskulins beobachtet wurde, konnte in derselben Zeit bei den Versuchen mit den Blättern eine Äskulinspaltung nicht nachgewiesen werden. Erst am vierten oder fünften Tage trat mitunter eine kaum merkliche Spaltung ein und selbst nach 10 Tagen war die Spaltung noch sehr gering.

Ein ähnliches Verhalten zeigten auch die Versuche mit den Blüten.

Versuche mit den Früchten.

Die Samenkapseln.

Die Versuche mit der stacheligen Fruchthülle ergaben durchwegs ein negatives Resultat. Weder der aus den zerkleinerten Kapseln erhaltene wässerige Extrakt noch der aus demselben durch Alkohol isolierte Körper vermochte das zugesetzte Äskulin zu spalten, selbst nach einer Einwirkungsdauer von 9 Tagen nicht.

Die Samen.

I. Ruhende Samen.

1. Die Samen im ganzen.

Die aus den gemahlenen Samen hergestellten Extrakte und das daraus isolierte Enzym ergaben in den wiederholt ausgeführten Versuchen bei ihrer Einwirkung auf Äskulin durchwegs positive Resultate. Insbesondere ergaben die mit dem isolierten Enzym ausgeführten Versuche bei verschiedener Konzentration der Enzymlösungen und bei verschiedener Versuchsdauer, daß bereits sehr verdünnte Lösungen (0·1prozentige)[1] auf Äskulin wirksam waren und daß schon nach 24 Stunden die erfolgte Spaltung des zugesetzten Äskulins nachgewiesen werden konnte.

Ein quantitativ ausgeführter Versuch ergab folgendes Resultat: 0·5 *g* des aus dem wässerigen Extrakte durch Alkohol isolierten Enzyms wurden in 40 cm^3 Wasser gelöst, die Lösung mit 0·2 *g* Äskulin versetzt und 40 Tropfen Chloroform hinzugefügt. Nach dreitägiger Einwirkungsdauer der Enzymlösung auf Äskulin bei 30° C. wurden nach wiederholtem Umkrystallisieren 0·0410 *g* Äskuletin erhalten; diese Menge entspricht 0·07677 *g* gespaltenen Äskulins, es wurden mithin von den zugesetzten 0·2 *g* Äskulin 38·38% gespalten.

2. Die Cotyledonen.
(Die geschälten Samen.)

Die geschälten und gemahlenen Roßkastaniensamen waren in Form eines Breies, dann in Form des filtrierten Extraktes und endlich in Form des aus letzterem durch Alkohol isolierten Enzyms auf Äskulin wirksam. In allen Fällen konnte eine enzymatische Spaltung des zugesetzten Äskulins nachgewiesen werden. Das isolierte Enzym bewirkte noch in 0·1prozentiger[1] Lösung nach 24 Stunden eine nachweisbare Spaltung des Äskulins.

[1] In Wirklichkeit war der Verdünnungsgrad der äskulinspaltenden Enzymlösung ein noch viel größerer, weil das nach der oben angegebenen Methode erhaltene Enzympräparat nicht aus dem äskulinspaltenden Enzym allein bestand, sondern noch andere durch Alkohol fällbare Stoffe enthielt, darunter auch verschiedene andere Enzyme.

3. Die Samenschalen.

Die von den Cotyledonenresten sorgfältig befreiten Samenschalen wurden fein gemahlen und wirkten wie bei den Versuchen mit den Cotyledonen als Brei, als filtrierter Extrakt und als isoliertes Enzym auf Äskulin ein. Die äskulinspaltende Kraft war in jeder Beziehung der der Cotyledonen vollkommen gleich.

II. Keimende Samen.

Die gekeimten Roßkastaniensamen, deren Würzelchen 18 bis 31 *cm* und deren Stengelchen 5 bis 11 *cm* lang waren, wurden in frischem Zustande zerkleinert und 24 Stunden unter Chloroformzusatz extrahiert, und zwar gesondert die Stengel, die Wurzeln und die Cotyledonen. Sowohl die erhaltenen Extrakte als auch die aus demselben durch Fällung mit Alkohol getrennten Substanzen wurden auf ihre äskulinspaltende Wirkung untersucht.

Die Versuche ergaben, daß der aus den Stengeln der jungen Keimpflanzen erhaltene Extrakt und der daraus durch Alkohol isolierte Körper bei einer 7tägigen Versuchsdauer ohne Einwirkung auf Äskulin war; daß dagegen die Wurzeln und die Cotyledonen der Keimpflänzchen ein auf Äskulin wirksames Enzym enthielten.

Versuche mit Amygdalin.

Es wurde weiterhin untersucht, ob die beobachtete Spaltung des Äskulins auf ein spezifisch äskulinspaltendes Enzym zurückzuführen ist oder ob es sich hiebei um die Wirkung eines schon bekannten Enzyms handelt; insbesondere würde hier eine Amygdalase in Betracht kommen, indem Emulsin und andere amygdalinspaltende Enzyme im Pflanzenreich weit verbreitet sind und Emulsin die Fähigkeit besitzt, Äskulin in Glukose und Äskuletin zu spalten.

Um diese Frage zu entscheiden, wurden die als auf Äskulin wirksam erkannten Extrakte und die daraus isolierten äskulinspaltenden Enzyme mit Amygdalin zusammengebracht; die Versuchsanordnung war analog wie bei den Versuchen mit Äskulin. Als Kontrollversuch wurde stets eine entsprechend kon-

zentrierte Emulsinlösung[1] verwendet, die unter denselben Versuchsbedingungen wie das äskulinspaltende Enzym auf Amygdalin wirkte. Die Prüfung auf Blausäure erfolgte sowohl nach der Berlinerblaumethode als auch nach der Ferrirhodanidreaktion.

Bei Einwirkung des Rindenextraktes (der Zweige) auf Amygdalin konnte selbst nach achttägiger Versuchsdauer keine Blausäure nachgewiesen werden, weder dem Geruche nach noch nach der Berlinerblaureaktion; während bei dem Kontrollversuch mit Emulsin bereits nach einigen Stunden ein deutlicher Geruch nach Blausäure, beziehungsweise Bittermandelöl beobachtet wurde und die Blausäure auch auf chemischem Wege durch Überführung in Berlinerblau nachgewiesen werden konnte.

Es wurde sodann die Wirkung des aus der Roßkastanienrinde isolierten äskulinspaltenden Enzyms auf Amygdalin untersucht; gleichzeitig wirkte Emulsin (Merck) in gleicher Konzentration auf gleich viel Amygdalin unter denselben Versuchsbedingungen ein. Auch hier trat bei dem Versuch mit Emulsin bereits nach kurzer Zeit der Geruch nach Blausäure auf, während bei dem Versuche mit dem äskulinspaltenden Enzym während der ganzen neuntägigen Versuchsdauer kein Geruch nach Blausäure, beziehungsweise Bittermandelöl beobachtet werden konnte. Nach zwei Tagen wurden gleiche Mengen der beiden Parallelversuche nach der Sulfocyaneisenreaktion auf Blausäure geprüft: bei Emulsin mit ausgesprochen positivem, bei dem äskulinspaltenden Enzym dagegen mit vollkommen negativem Erfolg. Auch bei den weiterhin teils nach der Ferrirhodanid-, teils nach der Berlinerblaureaktion ausgeführten Prüfungen reagierte nur die Lösung bei Emulsin auf Blausäure, nicht aber die beim äskulinspaltenden Enzym.

Ein aus Roßkastaniensamen hergestellter verdünnter wässeriger Extrakt bewirkte bei seiner Einwirkung auf Amygdalin nach 48 Stunden keine Spaltung, es konnte weder nach der Berlinerblaureaktion noch nach der empfindlicheren Ferrirhodanidprobe Blausäure nachgewiesen werden; erst am sechsten Tage wurden Spuren von Blausäure sichergestellt, indem sich die Lösung beim Prüfen auf Ferrirhodanid orangegelb färbte.

---

[1] Emulsin von E. Merck in Darmstadt.

Das aus den Roßkastaniensamen isolierte Enzym bewirkte in einprozentiger Lösung nach 24stündiger Einwirkung auf Amygdalin noch keine Spaltung, während Emulsin, bei gleicher Menge und Konzentration auf gleich viel Amygdalin unter denselben Versuchsbedingungen wirkend, bereits bei der nach achtstündiger Einwirkung vorgenommenen Prüfung Blausäure erkennen ließ. Erst am vierten Versuchstage konnten sehr geringe Mengen von Blausäure nachgewiesen werden, indem sich bei der Prüfung auf Berlinerblau die Lösung gelblichgrün färbte und nach einiger Zeit ein schwacher blauer Niederschlag entstand, während bei dem Kontrollversuch mit Emulsin gleich ein reichlicher blauer Niederschlag auftrat.

Diese schwach amygdalinspaltende Wirkung kommt aber nur den Cotyledonen zu, denn die Samenschalen allein bewirkten selbst in Form eines konzentrierten Extraktes innerhalb einer sechstägigen Versuchsdauer keine Spaltung des zugesetzten Amygdalins.

Die Versuche mit Amygdalin ergeben, daß in der Rinde und in den Samenschalen von *Aesculus* kein auf Amygdalin wirksames Enzym vorhanden ist und daß daher das in der Rinde und in den Samenschalen der Roßkastanie vorhandene äskulinspaltende Enzym keine Amygdalase ist.

Aber auch bei den Samen kann das äskulinspaltende Enzym nicht identisch sein mit dem die Spaltung des Amygdalins bewirkenden Enzym; denn, während das aus den Samen isolierte Enzym schon in 0·1 prozentiger Lösung bereits nach 24stündiger Einwirkung das zugesetzte Äskulin spaltete, bewirkte dasselbe Enzym selbst in 1 prozentiger Lösung nach 24 Stunden noch keine Spaltung des zugesetzten Amygdalins, dieselbe trat vielmehr erst nach viertägiger Einwirkung auf.

In der Rinde und in den Samenschalen ist zweifellos ein äskulinspaltendes Enzym vorhanden; bezüglich der Cotyledonen ist der direkte Beweis für die Existenz eines spezifisch äskulinspaltenden Enzyms nicht erbracht, insbesondere auch mit Rücksicht auf die im folgenden beschriebenen Versuche, die aber wieder anderseits zugunsten eines spezifisch äskulinspaltenden Enzyms in der Rinde und in den Samenschalen von *Aesculus* sprechen.

Das fettspaltende Enzym.

In den Samen der Roßkastanie wurde eine Lipase nachgewiesen, jedoch nur in den Cotyledonen, denn, wie die auch getrennt, d. h. mit den Samenschalen allein und mit den Cotyledonen für sich ausgeführten Versuche ergaben, fand eine Spaltung des zugesetzten Fettes nur bei den Versuchen mit den Cotyledonen statt, nicht aber bei den Versuchen mit den Samenschalen. Ebenso ergaben auch die Versuche mit der Rinde und den Blättern keine Fettspaltung.

Als Versuchsfett wurde Olivenöl benützt, welches mit dem Organbrei, mit dem wässerigen Extrakt oder mit dem isolierten enzymhaltigen Körper, im letzteren Fall unter Zusatz von etwas Wasser, zu einer Emulsion vermischt wurde; als Antiseptikum wurde Toluol, meist aber Chloroform verwendet; die Versuchstemperatur war wie bei den bisherigen Versuchen 30° C.

Um die enzymatische Fettspaltung sicherzustellen, wurde jeder Versuch doppelt ausgeführt, mit dem normalen und mit dem gekochten enzymhaltigen Körper. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde der Inhalt des Versuchsgefäßes mit der fünffachen Menge Alkohol geschüttelt, mit einigen Tropfen alkoholischer Phenolphthaleinlösung als Indikator versetzt und mit $^1/_{10}$-Normalnatronlauge unter wiederholtem Schütteln bis zur bleibenden Rosafärbung titriert. Da jeder Parallelversuch unter den vollkommen gleichen Versuchsbedingungen ausgeführt wurde, so ergab die Differenz in der verbrauchten Menge $^1/_{10}$-Normalnatronlauge zwischen dem Versuch mit dem aktiven und mit dem gekochten Enzym die Menge der enzymatisch gespaltenen Fettsäure.

Die Versuche mit den Roßkastaniensamen, sowohl die mit den Extrakten als auch die mit dem isolierten Enzym, ergaben je nach der Menge des enzymhaltigen Körpers und je nach der Versuchsdauer durchwegs eine mehr oder minder erhebliche Differenz. So betrug z. B. bei Einwirkung von je $0 \cdot 2 g$ des aus den Roßkastaniensamen isolierten Enzyms und je $4 cm^3$ Wasser unter Zusatz von gleichen Mengen Chloroform auf je $2 \cdot 7 g$ Olivenöl nach 5 Tagen die Differenz zwischen aktivem und

gekochtem Enzym 4·5 *cm*³ ¹/₁₀ Normalnatronlauge, entsprechend 127·0 *mg* enzymatisch gespaltener Ölsäure.

Dieser Befund, daß in den Roßkastaniensamen ein fettspaltendes Enzym vorkommt, gab Veranlassung, zu untersuchen, ob die Lipasen nicht Äskulin zu spalten vermögen. Zu diesem Zwecke ließ ich die aus den Samen von *Ricinus communis* durch Alkohol isolierte lipasehaltige Substanz unter denselben Versuchsbedingungen wie oben auf Äskulin einwirken; tatsächlich konnte ich eine Spaltung des zugesetzten Äskulins in Äskuletin und Glukose nachweisen.

Es entstand nun die Frage, ob die früher beobachtete Spaltung des Äskulins durch verschiedene Organe von *Aesculus Hippocastanum* nicht durch eine Lipase verursacht wurde. Zur Entscheidung dieser Frage ließ ich zunächst die Cotyledonen (die geschälten Samen) für sich und die von den Cotyledonenresten vollkommen befreiten Samenschalen allein auf Olivenöl einwirken.

Diese Versuche ergaben, daß nur die Cotyledonen eine Fettspaltung bewirkten, nicht aber die Samenschalen.

Bei den Versuchen mit den Samenschalen war die Menge der verbrauchten Kubikzentimeter ¹/₁₀-Normalnatronlauge bei dem aktiven und dem gekochten Enzym entweder gleich oder die Differenz so gering (durchschnittlich 0·1 *cm*³ ¹/₁₀-Normalnatronlauge), daß sie als innerhalb der Fehlergrenzen liegend angesehen werden konnte.

Bei den Versuchen mit den Cotyledonen dagegen war die Menge der verbrauchten Kubikzentimeter ¹/₁₀-Normalnatronlauge bei normalem Versuch durchwegs wesentlich größer als beim Versuch mit dem gekochten enzymhaltigen Körper, wie z. B. folgender Parallelversuch mit dem aktiven und gekochten Enzym zeigt: Je 0·4 *g* des aus den geschälten Roßkastaniensamen durch Alkohol isolierten Enzyms wirkten auf je 4·5 *g* Olivenöl bei Gegenwart von gleich viel Chloroform bei 30° C. Die am siebenten Versuchstage vorgenommene Titration mit ¹/₁₀-Normalnatronlauge ergab beim Versuche mit dem aktiven Enzym den Verbrauch von 12·8 *cm*³ ¹/₁₀-Normalnatronlauge zur Neutralisation, beim gekochten Enzym dagegen nur 4·2 *cm*³ ¹/₁₀-Normalnatronlauge. Die Differenz betrug demnach

$8 \cdot 6 \, cm^3$ $^1/_{10}$-Normalnatronlauge, entsprechend $242 \cdot 8 \, mg$ enzymatisch gespaltener Ölsäure.

Es ist daher kein Zweifel, daß in den Roßkastaniensamen, und zwar nur in den Cotyledonen derselben, nicht aber in den Samenschalen ein fettspaltendes Enzym enthalten ist.[1]

Aus diesen Versuchen ergibt sich bezüglich der oben gestellten Frage, ob in den Roßkastaniensamen eine Lipase oder ein spezifisch äskulinspaltendes Enzym die beobachtete Spaltung des Äskulins bewirkte, die Antwort, daß bei den Samenschalen die erfolgte Spaltung des Äskulins nicht durch eine Lipase erfolgte, sondern, da auch keine Amygdalase vorliegt, durch ein in den Samenschalen enthaltenes besonderes äskulinspaltendes Enzym.

Was die Cotyledonen anbelangt, so ist der direkte Beweis für ein in denselben vorhandenes spezifisch äskulinspaltendes Enzym nicht gelungen, denn eine Trennung des fettspaltenden Enzyms vom äskulinspaltenden Enzym war nicht möglich. Doch ist die Wahrscheinlichkeit, daß auch in den Cotyledonen ein besonderes äskulinspaltendes Enzym vorhanden ist, sehr groß, um so mehr, als die beobachtete, sehr schwach amygdalinspaltende Wirkung der Cotyledonen von der energisch äskulinspaltenden Wirkung derselben so verschieden war, daß sie nicht ein und demselben Enzym zugeschrieben werden kann. Es ist auch nicht anzunehmen, daß eine Amygdalase, die erst nach längerer Zeit eine schwache Amygdalinspaltung bewirkte, imstande sein sollte, energisch auf Äskulin einzuwirken; es ist vielmehr wahrscheinlicher, daß in den Cotyledonen der Roßkastaniensamen neben einem schwach amygdalinspaltenden Enzym auch ein besonderes äskulinspaltendes Enzym vorhanden ist.

Auf Grund sämtlicher mit den Roßkastaniensamen im ganzen und mit den Samenschalen und Cotyledonen getrennt

---

[1] Der Fettgehalt der Roßkastaniensamen beträgt nach O. Kellner, Die Ernährung der landwirtschaftlichen Nutztiere, 3. Aufl., p. 581:

Roßkastanien,	ungeschält,	frisch	1·5%	Rohfett
»	»	trocken	2·4	»
»	geschält,	frisch	3·0	»
»	»	und getrocknet	5·4	»

ausgeführten Versuche dürfte der Wahrscheinlichkeitsbeweis zulässig sein, daß in den Cotyledonen neben anderen Enzymen, insbesondere neben einem fettspaltenden Enzym auch ein besonderes, auf Äskulin wirksames Enzym enthalten ist.

Es wurde weiterhin die obige Frage bezüglich der Identität oder Nichtidentität der die Äskulinspaltung und die Fettspaltung bewirkenden Enzyme auch für die Rinde untersucht. Zu diesem Behufe wurde der Rindenextrakt und das daraus isolierte Enzym auf eine fettspaltende Wirkung geprüft, wobei ebenfalls stets Parallelversuche mit dem normalen und mit dem gekochten enzymhaltigen Körper unter denselben Versuchsbedingungen ausgeführt wurden.

In keinem Falle konnte eine enzymatische Fettspaltung des zugesetzten Fettes beobachtet werden; stets war die Menge der verbrauchten Kubikzentimeter $^{1}/_{10}$-Normalnatronlauge bei dem Versuche mit dem aktivem und mit dem gekochten Enzym entweder gleich oder die Differenz war so minimal, daß sie als innerhalb der Fehlergrenzen liegend angesehen werden mußte.

Auch bei den Versuchen mit den Blättern konnte eine Fettspaltung nicht beobachtet werden.

Aus den Versuchen mit der Rinde in ihrer Einwirkung auf Amygdalin und auf Fette ergibt sich demnach, daß die Roßkastanienrinde weder eine Amygdalase noch eine Lipase enthält und daß daher weder das eine, noch das andere Enzym die beobachtete Spaltung des Äskulins bewirken konnte, sondern daß dieselbe vielmehr einem spezifisch äskulinspaltenden Enzym zugeschrieben werden muß.

Die gesamten Versuchsergebnisse berechtigen zu dem Schlusse, daß in der Rinde und in den Samenschalen von *Aesculus Hippocastanum* ein besonderes, auf Äskulin wirksames Enzym enthalten ist; ich schlage für das äskulinspaltende Enzym den Namen »Äskulase« vor.

Zusammenfassung der Resultate.

In der Rinde und in den Samenschalen der Roßkastanie, *Aesculus Hippocastanum* L., wurde ein äskulinspaltendes Enzym nachgewiesen, welches Äskulin in Äskuletin und Glukose spaltet. Die Mitwirkung von Bakterien war ausgeschlossen. Das

isolierte Enzym war weder eine Amygdalase noch eine Lipase. Verfasser schlägt für das äskulinspaltende Enzym den Namen »Äskulase« vor.

In den Cotyledonen der Roßkastaniensamen ist höchstwahrscheinlich ebenfalls eine Äskulase vorhanden, doch konnte der direkte Beweis hiefür nicht erbracht werden, weil die Trennung der einzelnen isolierten Enzyme nicht möglich war.

In den Cotyledonen der Roßkastaniensamen wurde ferner ein fettspaltendes Enzym gefunden.
